

꽃사슴과 Holstein 젖소의 장내 혐기성 박테리아의 분리 및 특성

박소현* · 이기영** · 안중호* · 장문백*** · 김창현****

한경대학교 낙농과학과*, 한경대학교 생물정보통신전문대학원**, 중앙대학교 동물자원과학과***, 한경대학교 동물생명자원학과****

Studies on Isolation and Characterization of Anaerobic Bacteria from Gut of Holstein Cows and Korean Male Spotted Deer

S. H. Park*, G. Y. Lee**, J. H. Ahn*, M. B. Jang*** and C.-H. Kim****

Department of Dairy Science, Hankyong National University*,
Graduate School of Biotechnology and Information Technology, Hankyong National University**,
Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University***,
Department of Animal Life and Resources, Hankyong National University****

ABSTRACT

The purpose of this study was to isolate cellulolytic and hemicellulolytic anaerobic bacteria inhabiting from gut of ruminants and investigate their hydrolytic enzyme activities. Extracellular CMCase activities of H-strains isolated from the rumen of a Holstein dairy cow were higher than those of D- and DC- strains from the rumen and large intestine of Korean spotted deer. Most isolated bacteria utilized more efficiently Dehority's artificial medium containing starch, glucose and cellobiose (DAS) than those in Dehority's artificial medium containing cellulose only (DAC). The results of biochemical reactions and sugar fermentation indicated that the isolated bacteria belong to one of bacterial strains of *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Prevotella ruminicola/buccae*, *Clostridium beijer/butyricum* and *Streptococcus intermedi* which are not highly cellulolytic. Activities of Avicelase, xylanase, β -D-glucosidase, α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase of the isolated anaerobic bacteria in DAS were higher than those in DAC. In conclusion, the results indicated the higher enzyme activities of the isolated strains cultured in DAS medium were mainly caused by their specific carbohydrate utilization for enzyme production and growth rate. The highly cellulolytic bacteria were not isolated in the present experiment. Thus further research is required to investigate characteristics of gut bacteria from Korean spotted deer.

(Key words : Anaerobic bacteria, Enzyme, Korean spotted deer, Holstein cow)

I. 서 론

현재까지 상업용으로 사용되고 있는 미생물제재들은 곰팡이 발효추출물과 효모 배양물이 상품화되어 시판되거나 젖산균을 사용하고 있다. 이들 미생물제재들 중 *Lactobacillus bulgaricus*와

*Streptococcus*를 쥐에게 급여시 병원성 대장균의 장내 정착을 저해하였으며 (Duval-Iflah 등, 1998), 상업용 미생물첨가제로 사용되고 있는 *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*를 젖소에게 급여시 건물, 유기물, 조단백질 등의 소화율이 크게 향상된 것으로 나타났다 (Gomez-Alarcon,

Corresponding author : Chang-Hyun Kim, Department of Animal Life and Resources, College of Agricultural and Life Science, Hankyong National University, Anseung, 456-749, Korea.
Tel : 82-31-670-5095, Fax : 82-31-671-5091, E-mail : kimch@hknu.ac.kr

1991; Newbold 등, 1995). 이외에 사료첨가제로서 반추위로부터 분리한 곰팡이를 양에게 급여하였을 때 반추위내 미생물수가 증가하였으며, 반추위내 pH의 안정화, 영양소 소화율이 증가하고 질소 축적율이 높아진 것으로 나타났다 (Lee 등, 2000). 그러나 한편으로 미생물체제의 첨가가 동물의 소화율 향상에 영향을 주지 않는다는 연구결과도 보고되고 있다 (Martin과 Nisbet, 1990; Denigan 등, 1992).

국내 반추가축은 장기간 농후사료 위주로 사육되어 반추위 발효의 불안정으로부터 오는 번식 및 질병문제 등을 가지고 있다. 그러므로 이러한 사육조건하에서도 섭취된 조사료의 활용도를 증가시키어 난분해성 섬유질을 효과적으로 분해하고 반추위 발효를 안정화시키면서, 반추위 미생물의 단백질 합성량을 증가시킬 수 있는 미생물체제의 개발이 필요하다. 이와 같은 조건을 만족하기 위해서는 후보미생물을 다양한 곳에서 분리하는 것도 우수한 미생물을 개발하는데 좋을 수 있지만, 활용성 면에서는 숙주동물의 장내에서 분리하는 것이 가장 효과적이며, 또한 곰팡이나 효모보다는 숙주동물의 장내 서식하고 있는 박테리아를 분리 및 동정하여 그 이용가능성을 알아보는 것이 미생물체제로서의 효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로 본 연구의 목적은 직접 젖소의 반추위내에 존재하는 우수한 박테리아를 분리하고 산업적으로 이용가능성을 알아보는 것이다. 또한 현재까지 꽃사슴에 대한 사양관리와 관련된 연구들은 진행이 되어 왔지만 (문 등, 2002; 김 등, 2002) 꽃사슴의 반추위 및 장내 미생물들에 대한 연구는 거의 없는 상황이기 때문에 국내에서 이미 연구가 되어 있는 한우나 산양의 반추위에서 미생물을 분리하는 것보다는 비록 초식동물이지만 식생에서 차이가 있는 꽃사슴의 장내에서 우수한 섬유소 분해 미생물을 분리할 수 있는 가능성이 있을 것으로 생각된다. 본 연구는 젖소와 꽃사슴의 장내에서 혐기성 박테리아를 분리하였고 동정을 위해 성장형태, 생화학 및 당발효 특성을 조사하였다. 그리고 현대의 대량 사육되는 반추동물은 자연계에서 섭취하는 섬유질과는 달리,

옥수수나 곡류와 같이 전분을 많이 함유하는 사료를 섭취함으로써, 장내 pH가 저하되어 장내 cellulase 분비 균주들의 생육이 억제되고, 소화체계에 많은 장애를 일으키는 것으로 알려졌다(Mould 등, 1983; Slyter, 1976). 그래서 이러한 사양조건 특성에서 후보 박테리아를 선발하고자 전분과 섬유소의 배양기질에 따른 효소활력의 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 반추동물의 반추위와 대장으로부터 혐기성 박테리아의 분리

본 실험에서 공시동물로 반추위 캐놀러가 장착된 평균 체중 580 kg의 Holstein 건유우 2두와 꽃사슴 1두를 공시하였고, 공시동물의 사양관리에 있어 Holstein 건유우는 티모시 건초와 옥수수 사일리지를, 꽃사슴은 농후사료와 혼합건초를 3:7로 1일 2회 급여하였다. 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 혐기성 박테리아의 분리 및 배양을 위하여 Holstein 건유우의 반추위 캐놀러를 통하여, 꽃사슴은 도살 직후 반추위와 대장의 맹장 부위를 절개하여 고형물과 반추위액 및 대장액을 채취하였다. 채취된 소화물은 미리 보온되고 CO₂ gas가 충전된 보온병에 보관하여 실험실로 운반하였다. 채취한 소화물은 Leedle 과 Hespell (1980)의 방법으로 처리한 후, CO₂를 충전하며 4겹의 gauze로 여과하여 공시재료로 사용하였다.

채취한 공시재료는 섬유소 분해 박테리아를 분리하기 위하여 Enrichment 기법을 수행하였다. Dehority's artificial(DA) medium (Dehority, 1963)의 탄수화물공급원을 ball-milled filter paper(sigmacell)로 대체하여 선택배지를 준비하여 공시재료를 접종하여 배양액 속에서 섬유소분해균만 성장하도록 2~3일 동안 혐기배양을 실시한 후 배양액을 Bryant와 Burkey(1953)의 방법에 의하여 혐기 희석배지(anaerobic dilution solution)를 준비하였고, 십진희석법으로 희석하여 접종액으로 이용하였다. 접종액 1 ml을 2.0%의 agar가 함유된 9 ml의 전분, glucose 및 cellobiose가 함

유된 DA medium(DAS)으로 roll tube에 접종 시킨 후에 39°C의 배양기에서 2~7일간 배양하여 colony를 분리하였고, roll tube 상에 형성된 colony를 anaerobic gassing system을 이용하여 Hungate(1966)와 Holdman(1977)의 방법에 의하여 혐기적으로 순수 분리 하였다. 분리된 각 strain의 명칭을 D는 사슴의 반추위에서 분리한 혐기성 박테리아를 뜻하며, DC는 사슴의 맹장에서 분리한 혐기성 박테리아를 뜻하고, H는 Holstein 젖소의 반추위에서 분리한 혐기성 박테리아로 나타냈다. 본 실험에서는 반추동물의 반추위와 장내에서 혐기성 박테리아를 분리하여 분리된 혐기성 박테리아의 agar 배지 상에서 colony의 form, margin, elevation, color와 size를 조사하였다.

2. 분리된 혐기성 박테리아의 screening을 위한 섬유소 분해력조사

분리된 혐기성 박테리아들을 DA medium에서 혐기상태를 유지하여 계대 배양하였다. 섬유소 분해력을 측정하기 위하여 DAS 배지와 cellulose 만을 탄수화물 공급원으로 하는 DAC 배지에서 각 분리된 박테리아를 48시간 동안 배양기에서 배양한 후 배양액을 조효소액으로 사용하였다. 분리된 박테리아를 섬유소 분해력에 따라 선발하기 위해 섬유소 분해 효소 (Carboxymethylcellulase, CMCCase) 활성을 측정하여 섬유소 분해력을 조사하였다. CMCCase의 활성은 Miller 등(1960)의 방법에 의해 수행하였다.

3. 선발된 혐기성 박테리아의 생화학적 및 당발효 특성

선발된 혐기성 박테리아의 생화학 및 당발효 특성을 조사하기 위하여 API 20A(Biomerieux, REF 20 300)를 이용하였다.

4. 선발된 혐기성 박테리아의 특성 조사를 위한 가수분해 효소활력 조사

선발된 박테리아를 DA medium에서 혐기상

태를 유지하며 계대 배양을 하였고, 가수분해 효소의 활력을 측정하기 위하여 DAS와 DAC의 두 가지의 배지에서 각 분리 및 선발된 박테리아를 48시간 동안 배양한 후 배양액을 조효소액으로 사용하였다.

다당류 분해 효소인 Avicelase, xylanase는 Miller 등(1960)의 방법으로 활력을 측정하였다. Alpha-L-arabinofuranosidase, β -D-glucosidase 및 β -D-xylosidase와 같은 다당류 분해 효소의 활성 측정은 Kohchi와 Tohe(1986)의 방법에 따라 수행되었다. 효소 활성 단위(1unit)는 1분 동안 1 μ mol의 pNP의 생성량으로 환산하여 표시하였다. 효소활력 분석을 위해 각 균주 당 3반복으로 배양하였고 각 반복 당 2반복으로 각 반복간의 효소활력을 분석하였다. 본 실험의 결과로 얻어진 자료에 대한 통계처리는 SAS(Statistical Analysis System, 1996) package의 GLM(General Linear Model)을 이용하여 분산 분석을 실시하였고 처리 평균간 차이는 Duncan의 multiple range test로 유의수준 95%에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Holstein 젖소와 꽃사슴의 반추위와 대장으로부터 분리된 혐기성 박테리아의 colony 형태 및 특징

Holstein 젖소의 반추위로부터 40균주, 꽃사슴의 반추위로부터 66균주 및 대장으로부터 13균주를 분리하였고 Table 1과 Table 2에 각 colony의 형태적 특성을 나타내었다. Holstein 젖소에서 분리된 혐기성 박테리아의 colony는 지름(size)이 1~20 mm의 사이였고 대부분이 2~3 mm의 직경을 나타내었다. 분리된 colony의 형태(form)는 대부분 원형의 형태였다. H-10, 17, 19, 20, 22, 24, 28, 29, 32, 35, 및 H-38 등의 균들은 원형이 아니고 타원형 등의 불규칙한 형태로 관찰되었다. 특히 H-34 균주는 colony가 옆으로 퍼져나가는 spreading의 모양을 보였다. 대부분의 colony는 편평한 모양으로 성장하였으나 H-22, 23 및 H-24균은 볼록하게 agar 배지 표면 위로 colony가 위로 성장하는 모양(elevation)을

Table 1. Growth characteristics of strains isolated from the rumen of Holstein cows on Dehority's artificial agar medium

Strains	Colony appearance				
	Form	Elevation	Margin	Color	Size(mm)
H ¹⁾ - 1	Circular	Flat	Entire	White	2
H - 2	Circular	Flat	Undulate	White	1
H - 3	Circular	Flat	Entire	White	3
H - 4	Circular	Flat	Entire	Variable	2.5~3
H - 5	Circular	Flat	Entire	White	2
H - 6	Circular	Flat	Entire	Variable	2
H - 7	Circular	Flat	Entire	White	2.2
H - 8	Circular	Flat	Entire	Variable	2.5
H - 9	Circular	Flat	Entire	White	5
H - 10	Irregular	Flat	Entire	White	2
H - 11	Circular	Flat	Entire	Variable	3
H - 12	Circular	Flat	Entire	White	5
H - 13	Circular	Flat	Undulate	White	1.5
H - 14	Circular	Flat	Undulate	White	5
H - 15	Circular	Flat	Entire	White	2
H - 16	Circular	Flat	Entire	White	1
H - 17	Irregular	Flat	Entire	Yellow	2.5
H - 18	Circular	Flat	Entire	White	1
H - 19	Irregular	Flat	Undulate	White	2
H - 20	Irregular	Flat	Undulate	Yellow	2.5
H - 21	Circular	Flat	Entire	White	1.5
H - 22	Irregular	Convex	Undulate	White	5
H - 23	Circular	Convex	Entire	White	3
H - 24	Irregular	Convex	Undulate	White	6
H - 25	Circular	Flat	Entire	White	3
H - 26	Circular	Flat	Entire	Yellow in white	3
H - 27	Circular	Flat	Filamentous	White	6
H - 28	Irregular	Flat	Filamentous	White	10
H - 29	Irregular	Flat	Undulate	White	20
H - 30	Circular	Flat	Entire	White	3
H - 31	Circular	Flat	Entire	White	1
H - 32	Irregular	Flat	Undulate	White	5
H - 33	Circular	Flat	Entire	White	1
H - 34	Spreading	Flat	Undulate	White	3
H - 35	Irregular	Flat	Undulate	White	5
H - 36	Circular	Flat	Entire	White	2
H - 37	Circular	Flat	Entire	White	3
H - 38	Circular	Flat	Entire	White	2
H - 39	Irregular	Flat	Undulate	White	10
H - 40	Circular	Flat	Entire	White	2

¹⁾ H : Bacteria from the rumen of Holstein cows.

Table 2. Growth characteristics of strains isolated from the rumen of a Korean spotted deer on Dehority's artificial agar medium

Strains	Colony appearance				
	Form	Elevation	Margin	Color	Size(mm)
D ¹⁾ - 1	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 2	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 3	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 4	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 5	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 6	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 7	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 8	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 9	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 10	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 11	Circular	Flat	Entire	White	2
D - 12	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 13	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 14	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 15	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 16	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 17	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 18	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 20	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 21	Circular	Flat	Entire	White	2
D - 22	Irregular	Flat	Undulate	White	1
D - 24	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 25	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 26	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 27	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 28	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 30	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 31	Circular	Flat	Entire	Variable	2
D - 32	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 33	Circular	Flat	Entire	White	1
D - 34	Circular	Flat	Entire	White	1

¹⁾ D : Bacteria from the rumen of the Deer.

보였다. Colony의 가장자리(margin)의 형태도 다양하였는데 일부 균주는 undulate 즉, 기복이 있거나 filamentous 즉, 섬유상의 모양을 나타내었다. Colony의 색깔은 대부분 흰색으로 나타났으며 일부는 노란색이었고 H-4, 6, 11 및 H-26 등은 흰색바탕에 빛의 반사에 의한 무지개빛과 같은 다양한 색깔을 나타내었다. 꽃사슴의 반

추위와 대장에서 분리된 혐기성 박테리아의 colony의 형태는 젖소에서 분리된 혐기성 박테리아의 colony의 형태에 비하여 다양하지 않았으며 대부분이 원형 모양이었고, 또한 대부분이 편평하고 흰색으로 관찰되었다. 일부 D-22 및 D-64는 colony의 모양이 불규칙하였으며 가장자리 또한 불규칙하게 나타났다. Colony의

대부분은 1~2 mm 정도의 직경을 가지고 있으며, D-40 과 D-47은 약 5mm의 직경으로 나타났다. 김 (1995)이 보고하기를 한우의 반추위내 섬유소 분해 박테리아를 roll-tube 법에 의해 분리하여 colony를 확인하였을 때 대부분의 colony의 색이 흰색이 많았다고 하여 반추위내 박테리아의 대부분의 colony 색은 흰 색임을 알 수 있다.

2. 분리된 혐기성 박테리아의 섬유소 분해효소 활력

섬유소 분해력이 강력한 혐기성박테리아를 선별하기 위하여 extracellular 즉, 배양액 속에 분포하고 있는 CMCase 효소의 활력을 분리된 혐기성 박테리아 중에서 DA medium에서 성장률이 높은 28 균주에 대하여 조사하였다(Table 3). 14개 균주 중 H-18이 DAS 배지에서 배양되었을 때 123.18 $\mu\text{M}/\text{ml}/\text{min}$ 으로 다른 균주들에 비하여 유의적($p<0.05$)으로 가장 높은 섬유소 분해력을 나타내었고, H-7과 H-14는 H-18보다는 유의적으로 낮지만 다른 대부분의 균주보다 유의적인 높은 활력을 나타내었다($p<0.05$). H-6은 다른 균주에 비하여 가장 낮은 활력을 보였다($p<0.05$). DAC 배지에서 배양된 H균주들의 CMCase 활력 분석 결과 14개 균주 중 H-15가 유의적($p<0.05$)으로 가장 높은 활력을 보였고, H-1은 유의적($p<0.05$)으로 가장 낮았다. 대부분의 혐기성 박테리아들이 DAS 배지에서 배양된 것이 DAC 배지에서 배양된 혐기성 박테리아들 보다 CMCase 활력이 높게 나타났다. 또한 DAC 배지에서 배양시 탄소 공급원을 섬유소로 제한하였을 때 이용성이 높은 복합 탄수화물을 공급(DAS배지)시 보다 분리된 균주 간의 섬유소 분해효소활력간에 큰 차이가 나지 않음을 알 수 있다. 이러한 배지조성의 차이에 의한 활력의 차이는 미생물들이 생산하는 섬유소 분해효소들의 분자량의 차이에 원인이 있을 수 있다(Hobson, 1988). Wood 등 (1982)은 반추위 미생물이 반추위액이 없거나 섬유소만을 탄소공급원으로 하여 배양되었을 때 주로 저분자량의 섬유소 분해 효소들을 생산하였고, 이들

섬유소 분해효소들은 crystalline cellulose에 대한 가수분해력이 높지 않았다고 하였다. 반추위액에는 3-phenylpropionic acid가 존재하여 반추위액 대신 이 물질만 공급하여 *Ruminococcus albus*를 배양하였을 때 활력이 높은 고분자의 섬유소 분해효소를 생산하며 성장률 또한 빨랐다(Stack and Hungate, 1984). 반면에, 젖소에서 분리된 H-6, H-11, H-15 및 H-21번 박테리아들은 탄수화물 기질이 cellulose일 때 더 높은 효소활력을 나타내었다. 이런 결과는 반추위내 대표적인 섬유소 분해 박테리아인 *R. flavefaciens*, *R. albus*와 *F. succinogenes* 이 cellulose에 더욱

Table 3. Extracellular CMCase activity(glucose $\mu\text{mole}/\text{ml}/\text{min}$) of H-strains isolated from the rumen of Holstein cows and cultured on Dehority's artificial medium containing starch, glucose and cellobiose, or cellulose only as carbohydrate sources

No. of Strains	CMCase activity	
	DAS ¹⁾	DAC ²⁾
H ³⁾ -1	32.55 ^{fg}	9.00 ^d
H-4	94.13 ^{bc}	67.88 ^{bc}
H-5	74.17 ^{de}	67.36 ^{bc}
H-6	18.55 ^g	53.21 ^{bc}
H-7	98.54 ^b	51.49 ^c
H-9	90.84 ^{bcd}	64.59 ^{bc}
H-10	84.06 ^{bcd}	51.80 ^{bc}
H-11	38.08 ^f	58.04 ^{bc}
H-12	64.33 ^e	56.68 ^{bc}
H-14	100.17 ^b	65.82 ^{bc}
H-15	79.02 ^{cde}	99.19 ^a
H-17	31.08 ^{fg}	59.73 ^{bc}
H-18	123.18 ^a	75.29 ^b
H-21	43.41 ^f	60.63 ^{bc}
SEM	6.0018	3.7754

¹⁾ DAS : Dehority's artificial medium containing starch, glucose and cellobiose.

²⁾ DAC : Dehority's artificial medium containing cellulose.

³⁾ H : Bacteria from the rumen of Holstein cows.

SEM : Standard error of mean.

^{a,b,c,d} Means in the same column with different superscripts differ($p<0.05$).

특이적으로 효소생산성이 높은 것과 같이 일부 섬유소 분해균은 단순당을 이용하는 것보다 cellulose만 특이적으로 잘 이용하는 균들이기 때문에 생각된다(Dehority, 2003).

꽃사슴의 반추위와 장내에서 분리된 혐기성 박테리아들의 CMCase 활성을 조사하여 DAS와 DAC 배지에서 배양된 결과를 Table 4에 나타내었다. DAS 배지에서 배양된 균들 중 D-65가 유의적($p < 0.05$)으로 가장 높은 섬유소 분해 활성을 보였으며, D-65 보단 약간 낮지만 D-

58 역시 유의적($p < 0.05$)으로 높은 활성을 보였고, D-1은 가장 낮은 활성을 나타냈다. DAC 배지에서 배양된 균들 중 D-30이 가장 높은 활성이었고 D-24는 가장 낮은 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 꽃사슴의 반추위에서 분리된 혐기성 박테리아들은 젖소의 반추위에서 분리된 균들의 섬유소분해 특성과 달리 DAS 배지보다는 DAC 배지에서 활성이 높은 경향을 보였지만 이러한 차이는 유의적인 차이가 날 만큼 크지 않았다.

젖소의 반추위에서 분리된 혐기성 박테리아가 꽃사슴에서 분리된 박테리아에 비해 상당히 높은 섬유소 분해 효소활성을 나타내어 젖소와 꽃사슴간의 동물 간 차이가 있었다. 이러한 차이는 주로 사료에 의한 영향으로 젖소의 경우 주로 건초와 옥수수사일리지를 공급받는 건우우의 반추위 내용물에서 미생물을 분리한 반면, 꽃사슴은 조농비율이 3:7로 섬유질사료를 더 많이 섭취한 젖소에서 더 다양하고 섬유소 분해율이 우수한 미생물들이 많이 분포하였을 것으로 판단된다. 김 (1995)은 양질의 조사료인 알팔파에 암모니아 처리 볏짚의 첨가 비율을 달리하여 급여한 젖소의 반추위에서 채취한 반추위액내 섬유소 분해 박테리아 수가 알팔파를 단독 급여한 경우보다 볏짚과 함께 급여한 처리구에서 섬유소 분해 박테리아가 상대적으로 많이 존재한다고 하였다. 반추위내 총 섬유소 박테리아 수는 또한 종의 특성도 무시할 수 없으며 근본적으로 꽃사슴 자체가 가지고 있는 식생과 생리적 차이도 영향이 있었을 것으로 판단된다. Henke 등(1988)은 꽃사슴의 경우 수염류나 광엽초류와 목초류를 비슷한 수준으로 이용하여 다른 반추류에 비해 사료의 선택폭이 넓다고 보고해 사료에 따라 장내 섬유소 분해 미생물의 분포도 다양할 것으로 생각된다. 이와같은 이유로 꽃사슴의 소화기관내에 서식하는 미생물이 CMC를 기질로 하여 섬유소 분해력을 측정하였을 때 특이적으로 젖소에 서식하는 미생물보다 섬유소 분해력이 낮을 가능성을 배제할 수 없다.

섬유소 분해효소의 활성을 조사한 결과 대부분의 분리된 혐기성 박테리아들은 탄수화물공

Table 4. Extracellular CMCase activity(glucose μ mole/ml/min) of D- and DC-strains isolated from the rumen and cecum of Korean spotted deer and cultured on Dehority's artificial medium containing starch, glucose and cellobiose, or cellulose only as carbohydrate sources

No. of Strain	CMCase activity	
	DAS ¹⁾	DAC ²⁾
D ³⁾ - 1	1.18 ^g	7.13 ^{bc}
D - 4	2.42 ^{defg}	8.22 ^{abc}
D - 13	3.49 ^{cdefg}	7.82 ^{abc}
D - 18	4.67 ^{cd}	6.84 ^c
D - 24	2.19 ^{efg}	0.09 ^d
D - 30	4.31 ^{cde}	9.29 ^a
D - 34	3.67 ^{cdef}	8.85 ^{ab}
D - 56	1.34 ^{fg}	8.61 ^{abc}
D - 58	8.86 ^b	8.39 ^{abc}
D - 60	5.03 ^c	7.68 ^{abc}
D - 65	12.68 ^a	7.02 ^{bc}
DC ⁴⁾ - 1	3.61 ^{cdef}	8.39 ^{abc}
DC - 3	3.70 ^{cdef}	7.91 ^{abc}
DC - 7	3.04 ^{cdefg}	7.31 ^{bc}
SEM	0.5828	0.4260

¹⁾ DAS : Dehority's artificial medium with starch, glucose and cellobiose.

²⁾ DAC : Dehority's artificial medium containing cellulose.

³⁾ D : Bacterium from the rumen of the Deer.

⁴⁾ DC : Bacterium from the cecum of the Deer.

SEM : Standard error of mean.

^{a,b,c,d,e,f,g} Means in the same column with different superscripts differ($p < 0.05$).

급원이 cellulose일 때보다는 전분과 glucose 등이 복합적 즉, 이용성이 높은 탄수화물 기질에서 더 높은 CMCase의 활력을 나타내었다. 이 같은 결과는 앞서서도 언급하였지만 분리된 혐기성 박테리아들이 공급되는 탄수화물 기질의 종류에 따라 효소의 활력에 변화를 일으켰고 이것은 기질에 대한 미생물이 생산하는 섬유소 분해효소의 특이성과 미생물의 성장률의 변화에서 기인하였다. 본 CMCase 활력 결과를 기초로 D-56, D-58, D-65, DC-3, H-1, H-4, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15, H-17, H-18 및 H-21의 18균주를 선발하여 다당류 및 단당류 분

해 효소의 활력과 생화학 및 당발효 특성을 조사하였다.

3. 분리된 혐기성 박테리아의 생화학 및 당 발효 특성

선발된 18균주에 대하여 생화학 및 당발효 특성을 Table 5에 나타내었다. H-11과 H-12번 균주들은 붉은색의 양성반응을 보였지만 대부분의 균주들에서는 음성반응을 보였다. Urea에 대한 분해 반응은 모든 균주들에 대해서 음성을 나타내어 urea를 분해할 수 없는 것으로 판단되어 졌다. Table 5에서 gelatin을 분해하는

Table 5. Biochemical reactions and sugar fermentation by the selected strains isolated from the gut of Holstein cows and Korean spotted deer

Items	No. of Strains																	
	D ¹⁾ -56	D-58	D-65	DC ²⁾ -3	H ³⁾ -1	H-4	H-5	H-6	H-7	H-9	H-10	H-11	H-12	H-14	H-15	H-17	H-18	H-21
Indol	- ⁴⁾	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+ ⁵⁾	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Mannitol	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Saccharose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Salicin	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Xylose	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Arabinose	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Gelatin	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Glycerol	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Mannose	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Melezitose	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Raffinose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Rhamnose	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trehalose	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Gram reaction	-	+	-	-	-	+	ND ⁶⁾	-	-	+	+	ND	ND	+	+	+	+	-
Cocci	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1) D : Bacterium from the rumen of the Deer. 2) DC : Bacterium from the cecum of the Deer.
 3) H : Bacterium from the rumen of Holstein cows. 4) - : negative.
 5) + : positive. 6) ND : not detected.

혐기성 박테리아들은 대부분이 당 발효를 하지 않았고, 당 발효를 하는 혐기성 박테리아들은 gelatin을 분해하지 못하는 결과를 볼 수 있었다. 이 같은 결과는 gelatin을 분해하는 것은 섬유소 분해력보다 단백질 분해력이 더 강하다는 결과를 알 수 있었다. 꽃사슴에서 분리된 혐기성 박테리아들은 대부분이 당 발효를 하였고, D-56과 D-65는 당발효와 생화학적 특성이 일치하여 같은 종의 박테리아일 가능성이 높다. D-58은 xylose와 arabinose를 분해하였지만 DC-3은 분해를 하지 못하였다. 젖소의 반추위에서 분리된 균들 중 H-14, H-15와 H-17은 대부분의 당을 이용하지 못했고, H-14, H-15는 gelatin과 esculin을 분해하였다. H-21과 H-7은 D-56과 D-65와 같이 대부분의 당을 발효시켜 서로 다른 동물 종에서 분리된 미생물이더라도 기본적인 특성은 유사하여 같은 종일 가능성이 높았다. H-12균의 경우 대부분의 당을 이용하였고, indole에서 붉은색인 양성반응을 나타냈다. 그러나 일부 분석된 균들이 생화학적 및 발효특성 검사프로그램에서는 등록되어 있는 80개의 strain과는 일치하지 않는 박테리아들이어서 API kit를 이용한 test 만으로는 정확한 동정이 불가능하여 향후 16s rDNA 분석 또는 지방산 분석을 통한 동정 작업이 수행되어야 할 것이다.

본 생화학 및 당발효 특성으로부터 선발된 혐기성 박테리아들에 대한 동정결과 H-4, H-9, H-10, H-14, H-15 및 H-17은 *Peptostreptococcus* spp.였고, 이중 H-4, H-14 및 H-15는 현재 반추위에서는 분리되지 않은 *Peptococcus niger*일 가능성이 높았으며, H-17은 *Peptostreptococcus indolicus*일 가능성이 높았다. D-56, D-65, H-7 및 H-21은 *Bifidobacterium* spp. 일 가능성이 있는 것으로 보였다. H-1 및 H-6은 *Prevotella ruminicola*와 *P. ruminicola/buccae*로 동정이 되었고, 동정된 *Prevotella*종들은 gelatin을 분해하지 않았지만 수용성 당들을 분해한 결과로 보아 기존의 *P. ruminicola*와는 다른 특성을 나타내어 같은 *Prevotella* 속에 속하지만 다른 종의 균일 것이라 생각된다. DC-3은 *Clostridium beijer/butyricum*으로 동정되었고, D-58은 *Streptococcus intermedius*

로 동정되었다. 본 동정결과 분리된 혐기성 박테리아들 대부분이 비록 섬유소를 분해하는 능력이 있지만 섬유소 분해력이 높지 않은 균들이었다. *Fiberobacter succinogen*, *R. flavefaciens* 와 *R. albus*와 같은 강력한 섬유소 분해 효소는 분리되지 않았으며, 또한 공시된 18균주들 중 구균(cocci)이 11균주로 Hungate (1966)가 발표한 반추위내의 섬유소 분해 박테리아들은 간형이 다량 존재한다고 한 것과는 차이가 있었다. 본 실험에서 특히 많이 분리된 *Peptostreptococci* 속의 박테리아는 주로 어린 반추동물의 반추위에서 발견되었으며(Bryant 등, 1958; Jayne-Williams, 1979), 암모니아를 생성하는 박테리아로 탄수화물공급원 없이 아미노산에서 C-source를 공급받아 대사할 수 있는 박테리아 이다(Paster 등, 1993). 그러므로 이 균들이 우점적으로 많이 분리된 이유는 본 실험에서 반추위 섬유소 분해 박테리아 분리 및 배양시 이용된 Dehority's artificial medium(Dehority, 1963)의 질소공급원으로 acid-hydrolyzed casein을 이용하여 섬유소 분해균보다 빨리 성장하여 우점 하였기 때문으로 생각된다.

4. 선발된 혐기성 박테리아의 가수분해효소 활성 조사

선발된 18 균주에 대한 세부적인 발효특성 조사를 위하여 다당류 및 단당류를 분해할 수 있는 가수분해 효소인 Avicelase, xylanase, β -D-glucosidase, α -L-arabinofuranosidase 및 β -xylosidase의 효소활력을 Table 6와 7에 나타내었다. DAC 배지에 대해 꽃사슴에서 분리된 박테리아들의 가수분해 효소의 활성은 미미하여 Table 7에 제시하지 않았다. Avicelase의 분석 결과 DAS 배지에서 Avicelase의 활성은 최저 2.28에서 최고 42.28 μ mole/ml/min까지 분포하였고 그 중 H-14가 유의적($p < 0.05$)으로 효소 활성이 가장 높았다. 또한 DAC 배지에서 배양된 균들의 Avicelase의 효소 활성 결과는 H-4가 H-5, H-6, H-7, H-10과 H-11에 비해 유의적인 차이는 없었지만 나머지 비교된 균들에 비하여 유의적으로 높은 효소 활성을 나타내었다($p < 0.05$).

Xylanase 분석 결과 DAS 배지에서 배양된 균들 중 H-18이 398 $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 유의적($p<0.05$)으로 가장 활력이 높았다. 또한 H-18보다는 낮지만 H-12, H-14 및 H-15는 300 $\mu\text{mole/ml/min}$ 이상으로 높게 측정되었으나 수치적 차이일 뿐 유의적인 차이는 없었다($p>0.05$). DAC 배지에서 배양된 균들 중 H-5가 328.16 $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 xylanase 효소 활력이 H-4와 H-11을 제외하고 유의적으로 가장 높게 측정되었다($p<0.05$). Beta-D-glucosidase의 활력의 조사결과 DAS 배지에서 배양된 균들 중 H-1이 127 pNP $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 유의적으로 효소 활

력이 가장 높았으며($p<0.05$), H-1 보다는 유의적으로 낮지만($p<0.05$) H-6도 다른 균들과 비교하였을 때 효소 활력이 높았다. DAC 배지에서 배양된 균들 중 H-6이 유의적으로 효소 활력이 가장 높게 측정이 되었다($p<0.05$). Alpha-L-arabinofuranosidase의 활력 결과 DAS 배지에서 배양된 균들 중 H-1이 122.92 pNP $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 유의적($p<0.05$)으로 효소 활력이 가장 높았다. DAC 배지에서 배양된 균들 중 H-6이 73.54 pNP $\mu\text{mole/ml/min}$ 로 유의적($p<0.05$)으로 가장 높은 활력을 보였다. β -D-xylosidase의 활력 결과 DAS 배지에서 배양된 균들 중 H-1이

Table 6. Extracellular Avicelase(glucose $\mu\text{mole/ml/min}$), xylanase(xylose $\mu\text{mole/ml/min}$), β -D- glucosidase(pNP¹⁾ $\mu\text{mole/ml/min}$), α -L-arabinofuranosidase (pNP $\mu\text{mole/ml/min}$) and β -D- xylosidase (pNP $\mu\text{mole/ml/min}$) enzyme activities of identified strains cultured on Dehority's artificial medium containing starch, cellobiose and glucose as carbohydrate sources

No. of Strains	Extracellular enzyme (DAS ²⁾ medium)				
	Avicelase	Xylanase	β -D-glucosidase	α -L-arabinofuranosidase	β -D-xylosidase
D ³⁾ - 56	4.16 ^h	20.41 ⁱ	17.74 ^{jk}	23.22 ^{cdef}	21.15 ^{defg}
D - 58	5.38 ^{gh}	19.34 ⁱ	17.00 ^k	21.09 ^{cdefg}	24.97 ^{cd}
D - 65	5.40 ^{gh}	18.92 ⁱ	20.33 ^{jk}	26.32 ^{bc}	28.61 ^{bc}
DC ⁴⁾ - 3	2.82 ^h	33.97 ⁱ	16.81 ^k	24.77 ^{cd}	26.01 ^{bcd}
H ⁵⁾ - 1	3.97 ^h	40.44 ⁱ	127.88 ^a	122.92 ^a	388.51 ^a
H - 4	23.87 ^{cd}	333.13 ^c	65.03 ^{de}	22.57 ^{cdefg}	9.89 ^l
H - 5	24.64 ^{cd}	274.22 ^{def}	60.52 ^e	20.83 ^{cdefgh}	13.15 ^{ijkl}
H - 6	7.31 ^{gh}	96.92 ^h	118.33 ^b	30.73 ^b	30.36 ^b
H - 7	20.98 ^d	246.58 ^{fg}	70.42 ^{cd}	19.27 ^{defghi}	11.88 ^{kl}
H - 9	9.29 ^{fg}	282.13 ^{de}	66.08 ^{de}	23.61 ^{cde}	16.23 ^{ghijk}
H - 10	12.13 ^{ef}	261.24 ^{ef}	65.56 ^{de}	20.49 ^{cdefgh}	22.03 ^{def}
H - 11	5.20 ^{gh}	230.23 ^g	39.34 ^g	17.19 ^{efghij}	15.51 ^{hijk}
H - 12	16.09 ^e	346.16 ^{bc}	31.53 ^h	23.26 ^{cdef}	19.31 ^{efgh}
H - 14	42.28 ^a	366.66 ^b	53.75 ^f	16.84 ^{fghij}	18.04 ^{fghi}
H - 15	3.49 ^h	339.26 ^{bc}	23.89 ^{ij}	15.45 ^{hij}	12.43 ^{ijkl}
H - 17	31.06 ^b	219.38 ^g	24.24 ^{ij}	13.02 ^{ij}	17.32 ^{fghij}
H - 18	27.74 ^{bc}	398.29 ^a	75.63 ^c	16.15 ^{ghij}	24.02 ^{cde}
H - 21	12.50 ^{ef}	295.89 ^d	28.06 ^{hi}	11.28 ^j	24.02 ^{cde}
SEM	1.9152	22.3363	5.5066	4.0624	14.3155

¹⁾ pNP : paranitrophenyl.

²⁾ DAS : Dehority's artificial medium with starch, glucose and cellobiose.

³⁾ D : Bacterium from the rumen of the Deer.

⁴⁾ DC : Bacterium from the cecum of the Deer.

⁵⁾ H : Bacterium from the rumen of Holstein cows. SEM : Standard error of mean.

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l Means in the same column with different superscripts differ($p<0.05$).

Table 7. Extracellular Avicelase(glucose $\mu\text{mole/ml/min}$), xylanase(xylose $\mu\text{mole/ml/min}$), β -D-glucosidase(pNP¹⁾ $\mu\text{mole/ml/min}$), α -L-arabinofuranosidase(pNP $\mu\text{mole/ml/min}$) and β -D-xylosidase (pNP $\mu\text{mole/ml/min}$) enzyme activities of identified strains cultured on Dehority's artificial medium containing cellulose as a carbohydrate source

No. of Strains	Extracellular enzyme (DAC ²⁾ medium)				
	Avicelase	Xylanase	β -D-glucosidase	α -L-arabinofuranosidase	β -D-xylosidase
H ³⁾ -1	5.29 ^{cd}	7.75 ^f	13.83 ^{gh}	14.69 ^{fg}	17.57 ^{bc}
H-4	8.12 ^a	301.91 ^{ab}	82.98 ^c	25.10 ^b	18.61 ^{bc}
H-5	7.31 ^{ab}	328.16 ^a	76.24 ^{cd}	18.68 ^{de}	25.03 ^{bc}
H-6	6.65 ^{abc}	296.58 ^b	498.58 ^a	73.54 ^a	49.34 ^a
H-7	7.42 ^{ab}	255.73 ^c	94.33 ^b	20.07 ^c	20.17 ^{bc}
H-9	6.19 ^{bc}	297.05 ^b	80.32 ^{cd}	19.20 ^{cd}	31.11 ^b
H-10	7.69 ^{ab}	285.87 ^b	54.79 ^f	19.38 ^{cd}	18.26 ^{bc}
H-11	6.60 ^{abc}	308.50 ^{ab}	63.83 ^{ef}	18.16 ^{cdef}	47.78 ^a
H-12	5.29 ^{cd}	240.00 ^{cd}	69.15 ^{de}	17.99 ^{cdef}	19.31 ^{bc}
H-14	5.64 ^{cd}	252.98 ^c	74.29 ^{cde}	15.56 ^{defg}	20.00 ^{bc}
H-15	4.41 ^d	235.18 ^{cd}	20.92 ^g	10.87 ^h	12.53 ^c
H-17	5.17 ^{cd}	156.90 ^e	4.08 ^h	11.04 ^h	10.63 ^c
H-18	4.11 ^d	249.29 ^c	72.16 ^{cde}	15.03 ^{efg}	17.57 ^{bc}
H-21	5.45 ^{cd}	217.13 ^d	17.73 ^g	12.43 ^{gh}	14.27 ^{bc}
SEM	0.2468	15.2230	22.6244	2.9118	2.4049

¹⁾ pNP : paranitrophenyl.

²⁾ DAC : Dehority's artificial medium with cellulose.

³⁾ H : Bacterium from the rumen of Holstein cows.

SEM : Standard error of mean.

a,b,c,d,e,f,g,h Means in the same column with different superscripts differ(p<0.05).

388.51 pNP $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 다른 균들에 비해 유의적(p<0.05)으로 가장 높은 활력을 나타냈다. DAC 배지에서 배양된 균들 중 H-6과 H-11 각각 49.34와 47.78 pNP $\mu\text{mole/ml/min}$ 으로 다른 균들에 비해 가장 높은 효소 활력을 나타내었다(p<0.05). 전체적으로 모든 효소 활력 조사결과에서 DAS 배지에서 효소활력이 높았던 박테리아들이 DAC 배지에서 배양 한 경우에는 상반되는 결과를 나타냈다. H-4와 H-5는 DAC 배지에서는 다당류 분해효소인 Avicelase와 xylanase의 활력인 높은 반면 DAS에서는 다른 균에 비교하여 높지 않았다. 반대로 H-14, H-17 및 H-18은 DAS 배지에서는 이들 다당류 분해효소 활력이 높았고 DAC 배지에서는 상대적으로 낮은 활력을 나타내었다. H-1의 경우는 DAS 배지에서 단당류 분해효소인 β -D-glucosidase, α -L-arabinofuranosidase와 β -D-xylosidase

가 가장 활력이 우수하였지만 cellulose만 탄수화물공급원으로 제공하였을 때는 가장 낮은 활력의 미생물 그룹에 속하였다. H-6은 DAS 배지에서 앞의 3가지 효소에 대해 가장 높은 활력을 나타내었다. 그러므로 본 실험에서 분리된 혐기성 박테리아들은 앞의 CMCase 효소활력에서도 언급하였듯이 이용하는 배지조성 특히 탄수화물 공급원의 종류에 의하여 효소의 활력에 영향을 미치며 가수분해 효소의 종류에 따라 각 분리된 균주들마다의 다른 분포를 나타낸 것을 알 수 있었다.

Table 3에서의 섬유소 분해효소인 CMCase보다 Avicelase의 효소활력이 대부분의 박테리아에 있어 활력이 낮았는데 이러한 이유는 Avicelase는 exoglucanase로 섬유소의 말단을 공격하여 환원당을 방출하는 반면, endoglucanase인 CMCase는 무작위 양상으로 공격하여 chain의 길이를

급속히 짧게 하여 많은 cello-oligosaccharide를 생성하기 때문에(Hobson, 1988) Avicelase 보다 환원당의 배출량이 높은 CMCase의 활성이 더 높게 측정이 되기 때문이다. 일반적으로 반추동물에 soluble sugar의 급여량을 증가할 때 과잉의 산 발생에 의한 pH 감소와 cellulase의 활성 억제에 의해 섬유질 소화가 감소된다(Hungate, 1966). 그러나 이러한 요소들은 가용성 탄수화물의 함량이 낮은 완충능력이 뛰어난 배지로 순수 미생물들을 배양하였을 때에는 문제가 되지 않는 것으로 알려져 있다(Hiltner and Dehority, 1983). 본 시험에서도 순수한 박테리아균들을 단독으로 배양하였으며 배지 또한 완충능력이 뛰어났기 때문에 cellulase의 활성에는 큰 영향을 주지 않았으며 오히려 이들 starch나 glucose를 더욱 효과적으로 이용하여 박테리아들의 성장속도가 cellulase가 포함된 배지에서보다 빨랐기 때문에 가수분해 효소의 활성도 높았던 것으로 생각된다. Hemicellulose 분해와 관련된 효소들에서도 soluble sugar가 포함된 배지에서 xylanase 및 다른 hemicellulose 분해효소의 활성이 높은 균들이 cellulose 만이 포함된 배지에서는 반대로 낮게 측정되어 hemicellulose를 분해하는 효소들인 xylanase, α -L-arabinofuranosidase와 β -D-xylosidase 등도 배지내 carbon source의 종류에 영향을 받는다(Williams and Withers, 1982)는 것을 알 수 있었다. Greve 등(1984)도 미생물의 종류에 따라 효소활성에 있어서 배지의 조성에 영향을 받는다고 하였는데, *R. albus*는 filter paper를 공급하였을 때 xylanase를 생산하였지만 cellobiose를 공급하였을 때는 생산하지 못하였고, 반면 *R. flavefaciens*는 두 가지 carbon source에 관계없이 xylanase 효소를 생산하였다.

결론적으로 본 연구의 결과에서 젖소의 반추위로 분리된 H-18균이 DAS와 DAC 배지 모두에서 다당류 효소의 활성이 높아 가장 섬유소 분해력이 우수하며 단당류 분해효소에서는 DAS 배지에서는 H-1이 DAC 배지에서는 H-6균이 우수한 것으로 나타났다. 꽃사슴과 젖소는 같은 반추동물이지만 식생과 생리적 특성이 다르고 각 동물에 급여된 사료의 종류 및 급여 수준과 같은 요인들이 달랐기 때문에 다양한

colony의 형태와 가수분해 효소의 활성도 차이가 있었다. 젖소의 반추위에서 분리된 혐기성 박테리아가 꽃사슴에서 분리된 혐기성 박테리아에 비해 상당히 높은 섬유소 분해 효소활력을 나타내었고, 또한 대부분의 분리된 혐기성 박테리아들은 탄수화물 공급원이 cellulose일 때보다는 전분과 glucose 등이 복합적 즉, 이용성이 높은 탄수화물 기질에서 더 높은 CMCase의 활성을 나타내었다. 이 같은 결과는 분리된 혐기성 박테리아들이 공급되는 탄수화물 기질의 종류에 따라 효소의 활성에 변화를 일으켰고 이것은 기질에 따른 박테리아의 효소생산 특이성과 성장률의 변화에서 기인하였기 때문이다.

IV. 요약

본 연구는 꽃사슴과 Holstein 젖소의 반추위와 대장에 서식하는 미생물중 섬유소 분해력이 강한 혐기성 박테리아를 순수 분리하여 분리된 미생물들을 동정하고 이들 미생물들의 효소 특성을 구명하고자 수행되었다. 배지의 종류에 관계없이 젖소에서 분리된 박테리아가 꽃사슴에서 분리된 미생물에 비하여 섬유소 분해효소 활성이 우수하였고 탄소 공급원의 종류에 의해 섬유소 분해 효소의 활성에 영향을 미쳤으며 특히, cellulose 단독 공급시 보다 starch, glucose와 cellobiose를 복합한 탄소 공급원을 제공시 일반적으로 높은 효소의 활성을 나타내었다. API kit를 이용한 생화학 및 당발효 시험 결과 알려진 강력한 섬유소 분해 박테리아는 동정되지 않았고 대부분의 박테리아가 *Peptostreptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Prevotella ruminicola/buccae*, *Clostridium beijer/butyricum* 및 *Streptococcus intemedis*로 동정되었다. 분리된 균들의 다당류 및 단당류를 분해할 수 있는 가수분해 효소인 Avicelase, xylanase, β -D-glucosidase, α -L-arabinofuranosidase 및 β -xylosidase의 효소활력은 이용하는 배지조성 특히 탄소 공급원의 종류에 의하여 효소의 활성에 영향을 미치며 가수분해 효소의 종류에 따라 각 분리된 균주들마다 다른 분포를 나타내었다. 결론적으로 분리된

혐기성 박테리아들이 공급되는 탄수화물 기질의 종류에 따라 효소의 활력에 변화를 일으켰고 이것은 기질에 따른 박테리아의 효소생산 특이성과 성장률의 변화에서 기인하였기 때문이다.

V. 사 사

본 연구는 농림기술관리센터(ARPC)의 연구비 지원(과제번호 203106-03-HD110)을 받아 수행 되었다.

VI. 인 용 문 헌

- Bryant, M. P. and Burkey, L. A. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36:205.
- Bryant, M. P., Small, N., Bouman, C. and Robinson, I. M. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.*, 41:1747.
- Dehority, B. A. 1963. Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from *in vitro* rumen fermentations. *J. Dairy Sci.* 46:217.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press. Nottingham, U.K.
- Denigan, M. E., Huber, J. T., Alhadhrami, G. and al-Dehneh, A. 1992. Influence of feeding varying levels of Amaferm on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:1616.
- Duvla-Iflah, Y., Maisonneuve, S. and Ouriet, M. F. 1998. Effect of fermented milk intake on plasmid transfer and on the persistence of transconjugants in the digestive tract of gnotobiotic mice. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73(1):95.
- Gomez-Alarcon, R. A., Huber, J. T., Higginbotham, G. E., Wiersma, F., Ammon, D. and Taylor, B. 1991. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk yields, eating patterns, and body temperatures of lactating cows. *J. Anim. Sci.* 69(4):1733.
- Greve, L. C., Labavitch, J. M. and Hungate, R. E. 1984. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1135.
- Henke, S. E., Demarais, S. and Pfister, J. A. 1988. Digestive capacity and diets of white-tailed deer and exotic ruminants. *J. Wildl. Manage.* 52: 595-598.
- Hiltner, P. and Dehority, B. A. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:642.
- Hobson, P. N. 1988. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Science Publishers LTD. Essex, UK.
- Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*, 4th ed., Virginia Polytech. Inst. and State Univ. Blacksburg, Virginia. USA.
- Hungate, R. E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press. Inc., New York. USA.
- Jayne-Williams, D. J. 1979. The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. *J. Appl. Bacteriol.* 47:271.
- Kohchi, C. and Tohe, A. 1986. Cloning of *Candida pelliculosa* beta-glucosidase gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 203 (1):89.
- Lee, S. S., Ha, J. K. and Cheng, K. -J. 2000. Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 88:201.
- Leedle, J. A. Z. and Hespell, R. B. 1980. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:709.
- Martin, S. A. and Nisbet, D. J. 1990. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75(6):1736.
- Mould, F. L., Ørskov, E. R. and Mann, S. O. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects

- of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. Anim. Feed Sci. Technol. 10:15.
20. Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B. and McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. J. Anim. Sci. 73(6):1811.
 21. Paster, B., Russell, J. B. and Yang, C. M. 1993. Phylogeny of ammonia-producing rumen bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:107.
 22. SAS User's Guide : Statistics, Version 8. Edition. 1996. SAS Inst., Inc., Cary. NC. USA.
 23. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. J. Animal Sci. 43:910.
 24. Stack, R. J. and Hungate, R. E. 1984. Effect of 3-phenylpropanoic acid on capsule and cellulases of *Ruminococcus albus* 8. Appl. Environ. Microbiol., 48:218.
 25. Willams, A. G. and Withers, S. E. 1982. The effect of the carbohydrate growth substrate on the glycosidase activity of hemicellulose degrading rumen bacterial isolates. J. Appl. Bacteriol. 52: 389.
 26. Wood, T. M. and Wilson, C. A. 1984. Some properties of the endo-(1,4)- β -D-glucanase synthesised by the anaerobic cellulolytic rumen bacterium *Ruminococcus albus*. Can. J. Microbiol. 30:316.
 27. 김창현. 1995. 반추위 섬유소 분해 박테리아의 분리·동정 및 특성규명에 관한 연구. 서울대학교 석사학위논문.
 28. 문상호, 김명화, 이상무, 전병태. 2002. 꽃사슴에 있어서 옥립부산물 발효사료의 체내이용성에 관한 연구. 한국초지학회지. 22:169.
 29. 전병태, 문상호, 이상무, 권영재. 2002. 옥립부산물 발효사료 급여 꽃사슴에 있어서 채식기호성, 소화율 및 채식행동에 관한 연구. 한국초지학회지. 22:177.
- (접수일자 : 2005. 10. 20. / 채택일자 : 2006. 2. 7.)